

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06125783 A**

(43) Date of publication of application: **10.05.94**

(51) Int. Cl

**C12P 21/08**

**A61K 39/395**

**A61K 39/395**

**C12N 15/13**

**//(C12P 21/08 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **03359808**

(22) Date of filing: **28.12.91**

(71) Applicant: **CHEMO SERO THERAPEUT RES  
INST**

(72) Inventor: **MAEDA HIROAKI  
KURUMI KAZUHIKO  
EDA YASUYUKI  
SHIOSAKI KOICHI  
NAGATOMI KIYOSHI  
TOKIYOSHI YUKIO**

**(54) RECOMBINANT ANTI-HIV ANTIBODY AND ITS  
PREPARATION**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a gene fraction encoding a versatile region of an antibody having neutralizing activity against human immunodeficiency virus (HIV) and to prepare a recombinant anti-HIV antibody manifested by using the gene.

**CONSTITUTION:** A specific nucleic acid sequence of a gene fraction encoding a versatile region of H-chain and L-chain of an antibody having neutralizing activity against HIV is obtained. DNA synthesized from the base

sequence as a base is artificially fused with a gene encoding human immunoglobulin to give a mouse human chimera antibody having neutralizing activity against HIV and a mouse human modified antibody.

**COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-125783

(43)公開日 平成6年(1994)5月10日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 21/08

A 61 K 39/395

C 12 N 15/13

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

8214-4B

S 9284-4C

ADY D 9284-4C

ZNA

8931-4B

C 12 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数22(全 22 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平3-359808

(22)出願日

平成3年(1991)12月28日

(71)出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所  
熊本県熊本市清水町大塙668番地

(72)発明者 前田 浩明

熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142番地4-  
609

(72)発明者 来海 和彦

熊本県熊本市鶴羽田町1161

(72)発明者 江田 康幸

熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88

(72)発明者 塩先 巧一

熊本県菊池郡合志町幾久富1866-734

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換え抗H I V抗体およびその調製方法

(57)【要約】

【目的】 ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する中和活性を有する抗体の可変領域をコードする遺伝子断片、この遺伝子を用いて発現された組換え抗H I V抗体およびその調製法を提供する。

【構成】 H I Vに対する中和活性を有する抗体のH鎖及びL鎖の可変領域をコードする遺伝子断片の特異的核酸配列を得、この塩基配列をもとに合成したD N Aとヒト免疫グロブリンをコードする遺伝子とを人為的に融合させることによりH I Vに対する中和活性を有するマウス・ヒトキメラ抗体並びにマウス・ヒト改変抗体を得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR1～CDR3)のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体H鎖。

CDR1: Lys-Tyr-Gly-Met-Asn

CDR2: Typ-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-Val-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly

CDR3: Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr

【請求項2】 可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)であり、CDR2に隣接するFR2のC末側4個のアミノ酸配列がLys-Trp-Met-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側5個のアミノ酸配列がArg-Val-Thr-Met-Serであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がアルギニン(Arg)である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項3】 該組換え抗HIV抗体H鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号5に記載のアミノ酸順位1から119のアミノ酸配列である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項4】 該組換え抗HIV抗体H鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号1に記載のアミノ酸順位1から119のアミノ酸配列である請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項5】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体L鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR1～CDR3)のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体L鎖。

CDR1: Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

CDR2: Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr

CDR3: Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

【請求項6】 該組換え抗HIV抗体L鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号6に記載のアミノ酸順位1から107のアミノ酸配列である請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項7】 該組換え抗HIV抗体L鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号2に記載のアミノ酸順位1から107のアミノ酸配列である請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項8】 前記請求項1の組換え抗HIV抗体H鎖と前記請求項5の組換え抗HIV抗体L鎖とからなる組換え抗HIV抗体。

【請求項9】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR1～CDR3)のア

ミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体H鎖。

CDR1: Glu-Tyr-Thr-Met-His

CDR2: Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Thr-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly

CDR3: Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser

【請求項10】 可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)であり、CDR2に隣接するFR2のC末側2個のアミノ酸配列がIle-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側6個のアミノ酸配列がLys-Ala-Thr-Met-Thr-Valであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項11】 該組換え抗HIV抗体H鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号7に記載のアミノ酸順位1から118のアミノ酸配列である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項12】 該組換え抗HIV抗体H鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号3に記載のアミノ酸順位1から118のアミノ酸配列である請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖。

【請求項13】 マウス抗体由来のアミノ酸配列とヒト抗体由来のアミノ酸配列からなる遺伝子組換え抗体L鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR1～CDR3)のアミノ酸配列が下記の配列であることを特徴とし、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する組換え抗HIV抗体L鎖。

CDR1: Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

CDR2: Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser

CDR3: Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

【請求項14】 該組換え抗HIV抗体L鎖が改変抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号8に記載のアミノ酸順位1から111のアミノ酸配列である請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項15】 該組換え抗HIV抗体L鎖がキメラ抗体であって、可変領域の全アミノ酸配列が、配列表：配列番号4に記載のアミノ酸順位1から111のアミノ酸配列である請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖。

【請求項16】 前記請求項9の組換え抗HIV抗体H鎖と前記請求項13の組換え抗HIV抗体L鎖とからなる組換え抗HIV抗体。

【請求項17】 ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する抗体のH鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号1に記載の核酸順位1から357の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項18】ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する抗体のL鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号2に記載の核酸順位1から321の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項19】ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する抗体のH鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号3に記載の核酸順位1から354の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項20】ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する中和活性を有する抗体のL鎖可変領域もしくはその一部をコードするDNA断片であって、その核酸配列が、配列表：配列番号4に記載の核酸順位1から333の核酸配列またはその一部の核酸配列であるDNA断片。

【請求項21】請求項17のDNA断片と請求項18のDNA断片を用い、さらにヒト免疫グロブリンをコードするDNA断片を用いて、少なくとも相補性決定領域がマウス抗体由来のアミノ酸配列である組換え抗体を発現可能な発現ベクターを構築し、これを動物細胞内で発現させ、該抗体を回収することを特徴とする組換え抗HIV抗体の調製方法。

【請求項22】請求項19のDNA断片と請求項20のDNA断片を用い、さらにヒト免疫グロブリンをコードするDNA断片を用いて、少なくとも相補性決定領域がマウス抗体由来のアミノ酸配列である組換え抗体を発現可能な発現ベクターを構築し、これを動物細胞内で発現させ、該抗体を回収することを特徴とする組換え抗HIV抗体の調製方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するエイズ(AIDS)の治療および予防に期待できる新規な組換え抗HIV抗体に関する、さらに詳細には、マウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて発現された、HIVに対して中和活性を有する組換え抗HIV抗体(改変抗体およびキメラ抗体)ならびにその新規調製方法に関する。さらには、このような有用な組換え抗体の発現に有効なH鎖及びL鎖の可変領域をコードするDNA断片に関する。

##### 【0002】

【発明の背景】後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome:AIDS)は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するウイルス性疾患である。この疾患は1981年にアメリカで発見されて以来急速に世界中に広がりをみせているが、有効な

ワクチンや治療法はまだ提供されていない。

【0003】このような状況の中で、輸血によってHIV陽性となったサラセニアの患者グループと小児のAIDS及びARC(AIDS関連症候群)のグループにおいて、その臨床と中和抗体の関連についての報告がある[R.Guroffら, J.Immunol., 138, p3731, (1987); R.Guroffら, Pediatric Research, in press]。いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、in vivoにおける中和抗体の有効性を示唆している。このように抗HIV中和抗体はin vivoにおける感染の拡大防止や感染細胞の排除に役立つ可能性があり、現在臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が期待される。

##### 【0004】

【従来技術】上記のような抗HIV中和抗体をAIDSの患者から直接採取・調製するやり方もあるが、この方法は、倫理的な問題や原材料入手、バイオハザードの問題など数多い困難が予想される。そこで、このような高力価血清の代替品としてHIVウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術はすでにマウス型モノクローナル抗体において確立されているが、マウス抗体は副作用(マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こすことが考えられる)等の点からその臨床応用が難しく、最終的にはヒトモノクローナル抗体の使用が望ましい。

【0005】しかしながら、ヒトモノクローナル抗体の調製においては、目的の特異性を有する抗体を調製する点において克服する問題が多く、マウス型モノクローナル抗体の調製と比べて現実的には非常に困難を伴う。このような問題を克服すべく、抗体の特異性を特徴づける可変領域はマウス抗体由来のアミノ酸配列を有し、定常領域のアミノ酸配列をヒト抗体由来のものにした、遺伝子組換え技術を応用したキメラモノクローナル抗体の調製手法が最近報告されている。

【0006】このキメラモノクローナル抗体は、可変(V)領域の原料となるマウスモノクローナル抗体を產生するマウスハイブリドーマからクローニングしたV遺伝子と、定常(C)領域の原料となるヒト抗体産生細胞等のヒト細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-ヒト(C)キメラ抗体遺伝子を動物細胞あるいは微生物細胞等で発現させ、その培養上清中に得られるものである。キメラ抗体に関するいくつかの報告がすでに見受けられ[特開昭60-155132、特開昭61-47500]、本発明者らも既にキメラ抗体の作製に成功している[特開平2-2352]。さらに、このキメラ抗体の考え方を一層進めた改変抗体の作製も報告[特開昭62-296]

890] されている。

【0007】免疫グロブリン遺伝子についての解析は、最近の遺伝子操作技術の急速な発展に伴って急速に進みつつある。免疫グロブリン遺伝子は抗原との結合部位である可変領域（V領域）遺伝子と補体や特定の細胞と相互作用等に関与した生理活性を持つ定常領域（C領域）遺伝子により形成されていることがよく知られている。さらに、V領域遺伝子は、数あるV遺伝子断片群、D遺伝子断片群（L鎖ではまだ見つかっていない）及びJ遺伝子断片群の中からそれぞれ1個が選ばれこの順序で並んで結合することによって形成される。さらに、結合した遺伝子断片（V領域遺伝子）は体細胞突然変異によって細かな修飾を受け変化する。即ち、抗体の特異性はH鎖とL鎖のV領域遺伝子の中の各遺伝子断片の組合せと体細胞突然変異によって決定される〔利根川進, *Nature*, 307, p575 (1983); 本庶佑, *Annual Rev. Immunol.* 1, p499 (1983) 参照〕。従って、ある特定の抗原に対しては、特定のH鎖VDJ遺伝子断片と特定のL鎖のVJ遺伝子断片の組合せさらには特定の体細胞突然変異があると考えられる。しかも、これらの遺伝子断片の組合せやその核酸塩基あるいはアミノ酸配列を抗原側の構造、核酸塩基あるいはアミノ酸配列等から類推することは非常に困難であり、実際に抗体を産生している細胞から抗体遺伝子あるいは抗体蛋白質を単離しなくては決定できない。このように、抗体分子の可変領域のアミノ酸配列は抗原決定基毎に異なり、可変領域そのものは抗原ごとに全く異なるアミノ酸配列を有する。

【0008】本発明の対象となる組換え抗HIV抗体については、既に本発明者等が抗HIV中和組換え抗体として0.5 $\beta$ 組換え抗体を発表している〔特開平2-2352〕が、該組換え抗体はHTLV-IIIBを特異的に中和することはできるが、疫学上多いとされるHTLV-IIIMNを中和することはできなかった。前述のように、組換え抗体の作製には、目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっており、本発明の対象となるHIV、特にHTLV-IIIMNに対して中和活性を持つ抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが困難であったために、これまでこのHTLV-IIIMNに結合しこれを実質的に中和する組換え抗体が得られたという報告はない。

#### 【0009】

【発明の目的】このような状況において、本発明者らはHIV (HTLV-IIIMN) に対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞（ハイブリドーマ）から、該抗体の可変領域をコードする遺伝子を分離することに成功し、さらにこれを用いてマウスヒト組換え抗体の発現を試みた結果、HIV (HTLV-IIIMN) に対して中和活性を有する組換え抗HIV抗体の作製に成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、これまでに

一切報告されていない抗HIV中和抗体の可変領域をコードする遺伝子を提供し、これを用いて形質転換細胞内で発現される組換え抗HIV抗体を提供するものであり、この新規抗HIV組換え抗体からなる副作用の少ないAIDS診断薬・治療薬・予防薬の開発を可能にすることを目的とするものである。

#### 【0010】

【発明の構成および効果】本発明に用いる抗HIV (HTLV-IIIMN) マウスモノクローナル抗体産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて作製される。例えば、マウスを種々の適当な免疫原、例えばHIV (HTLV-IIIMN) 産生細胞から得られるウイルス粒子、もしくは精製外皮膜糖蛋白質gp120、もしくは遺伝子組換え技術を用いて調製される組換えペプチド、好ましくはgp120のアミノ酸配列第247-370に対応する組換えペプチド、もしくは該ウイルス蛋白のアミノ酸配列に基づいて調製される好適な合成ペプチド、好ましくはgp120のアミノ酸配列第303-325に対応する合成ペプチド等で免疫し、得られた脾臓細胞をマウスのミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマから、精製外皮膜糖蛋白質gp120、もしくは前記組換えペプチド、もしくは前記合成ペプチドに反応する細胞を選択し、該細胞を培養することによって調製することができる。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の中からHIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択する。HIVの場合その特有の性質からこのような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者等はHIV (HTLV-IIIMN) に対して中和活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ $\mu$ 39.1あるいは $\mu$ 5.5細胞の確立に成功しており〔特願平2-188300〕、これらが本発明に用いる最も好ましい細胞株としてあげられる。

【0011】本発明の可変領域をコードする遺伝子断片は、このような抗HIV中和モノクローナル抗体産生細胞より分離され、解析された遺伝子配列である。しかしながら前にも述べたように、このような細胞は目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードする遺伝子の他に、数多いV領域構成遺伝子群を有している（例えば、マウス抗体の特異性を決定するVH鎖のV遺伝子群だけでも少なくとも100種以上異なる遺伝子を持ち、D遺伝子群として11種以上、J遺伝子群として4種の遺伝子を持っている。同様にVK鎖のV遺伝子群としては約300種以上の遺伝子、J遺伝子群としては4種の遺伝子を保有している）ため、細胞の持つ染色体遺伝子の中から、目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードしている遺伝子を分離することが必要である。V領域遺伝子は通常の遺伝子操作技術により単離することができる。例えば、その細胞の染色体DNAから常法〔例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor L

ab. (1982) 参照]に従ってV領域遺伝子をクローニングする方法、あるいは、その細胞のmRNAを材料として常法

[例えば、D. M. Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRL press (1985)]によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングの為のプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列 [例えば、坂野ら、Nature, 286, p676, (1980); E. E. Maxら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)] を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが出来る。また、PCR(ポリメラース連鎖反応)を利用したクローニングも可能である [R. Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833 (1989); W. D. Huse, et al., Science, 246, 1275 (1989)]。

【0012】このようにしてクローニングされたV領域遺伝子をキメラ抗体作製法 [特開平2-2352] や改変抗体作製法 [特開昭62-296890] のような種々方法により遺伝子解析を行なった。その結果、抗HIV抗体V領域をコードする本発明の遺伝子断片は、その特異的な遺伝子配列として、H鎖をコードする遺伝子に、

(H-a)

- (a) Lys-Tyr-Gly-Met-Asn
- (b) Typ-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-Va  
l-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly
- (c) Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr

または、

(H-b)

- (a) Glu-Tyr-Thr-Met-His
- (b) Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr-Th  
r-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly
- (c) Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser

のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に含み、またL鎖をコードする遺伝子に、

(L-a)

- (a) Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Gly-Ala-Asp-Val-Ala
- (b) Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr
- (c) Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

または、

(L-b)

- (a) Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Se  
r-Tyr-Met-Asn
- (b) Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser
- (c) Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に有することを特徴とすることが見い出された。このような上記のH鎖、L鎖に含まれるそれぞれ3種のアミノ酸配列は、抗体分子の結合能を決定する重要なアミノ酸配列と考えられ、このようなアミノ酸配列が、HIVに対する中和活性を有する抗体分子の機能と密接に関連しているものと考えられた。すなわち、Kabatらにより報告さ

れている抗体遺伝子の一般的な解析 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th. ed. U.S. Department of Health and Human Services (1987)] の結果を参照することにより、上記のアミノ酸配列は、本発明の抗HIV抗体の抗体活性を決定する可変領域の相補性決定領域 (CDR1~CDR3) の配列であることが見いだされた。このような抗HIV中和活性を有する抗体分子の可変領域をコードする遺伝子として、H鎖、L鎖それぞれ図1、または図3、図2または図4のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片がその好ましい一例として挙げられる。また、そのような遺伝子の具体的な核酸塩基配列の一例としては、H鎖、L鎖それぞれ図1または図3、図2または図4に示された核酸塩基配列が挙げられる。

【0013】このように本発明により提供される上記の核酸配列をもとに、HIVに対して中和活性を有する組換え抗体を調製することが可能となる。すなわち、このような組換え抗体の可変領域をコードする遺伝子として、その相補性決定領域をコードするDNA断片として、上記に示したアミノ酸配列をコードするよう合成DNA等をそれぞれ調製し、これをヒト免疫グロブリンを

コードする遺伝子と融合させることにより、目的の組換え抗HIV抗体、すなわち、抗HIVキメラ抗体または抗HIV改変抗体を調製することが可能となる。このようにして調製される本発明の組換え抗HIV抗体は、そのH鎖可変領域の相補性決定領域として下記の配列 (CDR1~CDR3) を有することを特徴とする。

【0014】(H-A)

CDR1 : Lys-Tyr-Gly-Met-Asn

CDR2 : Typ-Lys-Asn-Thr-Asn-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-His-  
Val-Glu-Glu-Phe-Lys-Gly

CDR3 : Glu-Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Gly-Phe-Ser-Tyr

または

(H-B)

CDR1 : Glu-Tyr-Thr-Met-His

CDR2 : Gly-Ile-Asn-Pro-Asn-Asn-Gly-Asp-Thr-Ser-Tyr  
Thr-Gln-Lys-Phe-Lys-Gly

CDR3 : Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Ala-Ile-Asp-Ser

【0015】また、L鎖可変領域の相補性決定領域として下記の配列 (CDR1~CDR3) を有することを特徴とする。

(L-A)

CDR1 : Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Gly-Ala-Asp-Val-Ala

CDR2 : Trp-Ala-Ser-Thr-Arg-His-Thr

CDR3 : Gln-Gln-Tyr-Ser-Ser-Phe-Pro-Leu-Thr

または、

(L-B)

CDR1 : Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn

CDR2 : Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser

CDR3 : Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr

【0016】さらに、本発明者らは、改変抗体を調製する際には、これまで報告されているように、上記の相補性決定領域のみマウス由来のアミノ酸配列に組換えるよりも、さらに相補性決定領域に隣接するフレーム(FR)領域の一部についてもマウス由来の配列に組換えることで、より本来の抗体活性を維持した組換え抗体が得られることを見いだした。

【0017】すなわち、H鎖可変領域遺伝子として上記(H-A)の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)であり、CDR2に隣接するFR2のC末側4個のアミノ酸配列がLys-Trp-Met-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側5個のアミノ酸配列がArg-Val-Thr-Met-Serであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がアルギニン(Arg)であるH鎖可変領域遺伝子を調製することにより優れた効果を有する抗HIV改変抗体を調製することができる。同様に、H鎖可変領域遺伝子として上記(H-B)の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR1に隣接するFR1のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)であり、CDR2に隣接するFR2のC末側2個のアミノ酸配列がIle-Glyであり、CDR2に隣接するFR3のN末側6個のアミノ酸配列がLys-Ala-Thr-Met-Thr-Valであり、さらにCDR3に隣接するFR3のC末側1個のアミノ酸がスレオニン(Thr)であるH鎖可変領域遺伝子を調製することにより優れた効果を有する抗HIV改変抗体を調製することができる。また、L鎖可変領域遺伝子として上記(L-A)の相補性決定領域配列を利用する際には、可変領域の相補性決定領域CDR2に隣接するFR2のC末側1個のアミノ酸がセリン(Ser)であるL鎖可変領域遺伝子を調製することが好ましい。

【0018】このようにして調製される、本発明の抗HIV改変抗体のH鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列の好ましい例としては、図9または図11に示された配列を挙げることが出来る(図中、マウス由来のアミノ酸配列の領域を下線にて示す)。また、一方、本発明の抗HIV改変抗体のL鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列の好ましい例としては、図10または図12に示された配列を挙げることが出来る(図中、マウス由来のアミノ酸配列の領域を下線にて示す)。

【0019】一方、本発明に従い、抗HIVキメラ抗体を調製する際には、H鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列として、図1または図3に示された配列がその好ましい一例として挙げられる。また、L鎖可変領域をコードする遺伝子の核酸配列およびアミノ酸配列としては、図2または図4に示された配列がその好ましい一例として挙げられる。

【0020】一方、抗HIV組換え抗体作製に用いられるヒト免疫グロブリンH鎖遺伝子並びにL鎖遺伝子の定

常領域(C)遺伝子は、例えばヒト抗体産生細胞から同様の方法により単離することが出来る。また、C領域遺伝子はその遺伝子内で再配列を行ないので特にヒトC領域遺伝子を単離するためにヒト抗体産生細胞を使う必要はない。単離する方法としては、前述のマウスV領域遺伝子の単離の場合と同様にして行なうことができる。また、C領域遺伝子の種類としては、特に $\gamma$ 1鎖、 $\kappa$ 鎖に限つたものではなく、 $\mu$ 鎖、 $\alpha$ 鎖、 $\gamma$ 2鎖、 $\gamma$ 3鎖、 $\gamma$ 4鎖、 $\epsilon$ 鎖、 $\lambda$ 鎖の各鎖の遺伝子でも可能である。しかし、補体活性化能、抗体依存性細胞傷害活性を期待するならば、 $\gamma$ 1鎖が望ましい。

【0021】抗HIV組換え抗体遺伝子は、H鎖遺伝子もL鎖遺伝子も、基本的に上記2種の遺伝子断片(V領域遺伝子とC領域遺伝子)を結合させることにより構築される。例えば、渡辺らによって既に示された方法[渡辺ら、Cancer Research, 47, p999-1005, (1987)]やM. Bruggemann[Waldmann H (ed) Monoclonal Antibody Therapy. Prog Allergy. Basel, Karger, 1988, vol 45, pp 91]やS. L. Morrison[Advances in Immunology, 44, 6 20, 5, (1989)]等の総説に紹介されている方法に準じて行なうことが出来る。また、発現させる宿主によって動物細胞発現系、大腸菌発現系、酵母細胞発現系などベクターシステムが異なるが、いずれの場合でも発現可能である。更に、DHF R等の遺伝子增幅系を使うことも可能である。

【0022】このようにして得られる本発明の組換え抗体は、HIVに対して中和活性を有していることが確認され、本発明によりこれまでになかった抗HIV組換え抗体を調製することが可能となった。このような抗HIV組換え抗体は、AIDSの臨床において、これまでになかった実質的に有効なAIDS治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、HIVに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を応用して目的の抗体分子を修飾、または一部置換等することにより、より優れた抗HIV組換え抗体分子の開発を可能にするものである。

【0023】次に、実施例に従い、本発明をさらに詳細に説明するが、これにより本発明が限定されるものではない。

#### 【0024】

##### 【実施例】

(1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の作製  
抗HIVマウスモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマの作製方法は以下に示す通りである。免疫抗原として、HTLV-IIIMN株外皮膜糖蛋白質gp120のアミノ酸配列第303~325番目に対応する合成ペプチド(SP-1: YNKRK RIHIGPGRAYTTKNIIG) 及び合成ペプチドをKLH(キー

ホールリンペットヘモシアニン)と結合させたペプチド-KLHコンジュゲート、あるいはHTLV-IIIMN産生細胞(H9/HTLV-IIIMN)培養上清よりショ糖密度勾配遠心により得たウイルス粒子、あるいはH9/HTLV-IIIMN培養液より得た細胞を1%トリトンX-100にて溶解後ConA-セファロース4BカラムとHIV抗体(IgG)-セファロース4Bカラムにてアフィニティー精製して得たgp120、さらにH9/HTLV-IIIMN細胞の高分子量DNA(genomic DNA)よりHTLV-IIIMN gp120 V3ドメイン(アミノ酸247-370)をコードするDNA断片をPCR法で增幅単離[G.I.LaRosaら、Science Vol.249 p932(1990)]し、pUEX2(アマシャム製)発現ベクター用いて大腸菌で発現させたHTLV-IIIMN gp120 V3ドメイン(アミノ酸247-370)β-ガラクトシダーゼ融合蛋白、等を組み合わせて使用した。これらの免疫原でBALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を採取し、P3X63Ag8-U1X63マウスミエローマ細胞[ATCC CRL 1597]とポリエチレンギリコール(シグマ社)を用いて細胞融合を行いクローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体の前述の免疫原への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、ウエスタンプロット法及び間接蛍光法を用いて確認し、抗HIVモノクローナル抗体、μ39.1あるいはμ5.5を产生するハイブリドーマを確立した[特願平2-188300、寄託番号: μ39.1(微工研菌寄第11472号)、μ5.5(微工研条寄第3402号)]。これらの抗体はSP-1ペプチドに結合し、HIV感染細胞と非感染CD4陽性細胞間の合胞体形成(syncytium formation)を抑制する。さらに、これらの抗体とHIVウイルスを混和し細胞(H9)へ感染させるウイルス中和試験においても中和活性を確認している。以下に述べる本発明の抗HIV組換え抗体のV領域遺伝子の調製には、該中和活性を有するこれらの抗HIVマウスモノクローナル抗体を產生する細胞(μ39.1、μ5.5細胞)を使用した。

#### 【0025】(2) 抗HIV抗体マウスV領域遺伝子の単離

マウス免疫グロブリン可変(V)領域遺伝子の単離については以下のように行った。μ39.1、μ5.5細胞から常法[D.M.Glover編集“DNA cloning Vol. I”IRLpress(1985)]に従って全RNAを抽出し、cDNA合成システム・プラス(アマシャム)を用いて1本鎖cDNAを合成した。この1本鎖cDNAを鑄型に、Kabatら[Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987]の分類したV領域とJ領域の核酸塩基配列をもとにして合成したDNAプライマーを用いてポリメラース連鎖反応(PCR)を行なった。V領域プライマーとJ領域プライマーにはそれぞれHindIIIとBamHIサイトが付加されている。PCRはシータス社のプロトコールに従って行なった。すなわち、これらのプライマーはともに100pmolを使い、PCRの試薬はCETUS社のキットを使用した。

PCRの条件は、94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分で25サイクル行なった。PCR後、得られたDNA断片をpUC18(宝酒造製; 以下本実施例で使用した試薬は特に断りのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した)のHincI Iサイトへサブクローニングした。

#### 【0026】(3) 抗HIV抗体マウスV領域遺伝子の核酸塩基配列

東洋紡社のシークナーゼVer.2キットを用いて、pUC18に組み込まれたV領域遺伝子をシークエンスした。その結果得られたμ39.1、μ5.5の核酸塩基配列を図1から図4に示す。また、その核酸塩基配列から得られるアミノ酸配列についても同様に図1から図4に示す。μ39.1、μ5.5いずれの核酸塩基配列もV領域遺伝子特有の再配列を起こしており、しかも発現可能なオーブンリーディングフレーム(ORF)をとっていた。

#### 【0027】(4) 抗HIVキメラ抗体の作製

(2)で単離されたμ39.1、μ5.5V領域遺伝子が本当に抗HIV活性を担うV領域をコードする遺伝子であるかどうかを確認するために、マウスヒトキメラ抗体が作

20 製された。キメラ抗体の発現のためにヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のエンハンサー、プロモーター[N.Whittle, et al., Protein Engineering, 1, 499(1987)]を持った発現ベクターHCMV-κ,HCMV-γ1がそれぞれ使われた。HCMV-κはヒトκ鎖定常領域遺伝子を持ちHCMV-γ1はヒトγ1鎖定常領域遺伝子を持つ。前述の(2)で調製されたμ39.1V領域をHindIIIとBamHI制限酵素で消化し、VH、VL断片をそれぞれHCMV-γ1、HCMV-κのHindIII-BamHIサイトに組み込んだ。μ39.1キメラ抗体遺伝子発現ベクター(それぞれCHμ39.1、CLμ39.1)の構造を図5、図6に示す。また、μ5.5VH、VL領域遺伝子も、μ39.1の場合と同様にして、HCMV-γ1、HCMV-κにそれぞれ組み込んだ(それぞれCHμ5.5、CLμ5.5; 図5、図6参照)。

#### 【0028】(5) 抗HIVキメラ抗体の発現

上記のように構築したμ39.1あるいはμ5.5キメラ抗体遺伝子の持つ抗体活性をCOS7細胞[ATCC CRL 1651]を用いた一時的発現系で検討した。CHμ39.1及びCLμ39.1プラスミドDNAの混合物、あるいはCHμ5.5及びCLμ5.5プラスミドDNAの混合物をBio-Rad社製のElectroporation装置を用いて、Boi-Rad社のプロトコールにしたがってCOS7細胞に導入し、10%牛胎児血清を含むDMEM培地(GIBCO社)で培養した。3日後その培養上清を回収し、抗ヒトIgGあるいはSP-1抗原ペプチドを用いたELISA法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果図7に示すように、CHμ39.1及びCLμ39.1プラスミドDNAの混合物、あるいはCHμ5.5及びCLμ5.5プラスミドDNAの混合物のいずれの発現産物もSP-1ペプチドに結合した。従って(2)で単離したμ39.1、μ5.5V領域遺伝子は間違いなく抗HIV活性を持った抗体の50 V領域をコードしている遺伝子であることが確認され

た。

#### 【0029】(6) 抗HIV改変抗体の作製

クローニングした $\mu$ 39.1、 $\mu$ 5.5のVH、VL領域の中で、どの領域が抗原結合に関して重要であるかどうかを調べるために、 $\mu$ 39.1及び $\mu$ 5.5のCDR（相補性決定）領域をそれぞれヒトV領域へ移植した。方法は、改変抗体作製方法〔特開昭62-296890〕にしたがった。 $\mu$ 39.1及び $\mu$ 5.5のVH領域のCDR領域はヒトサブグループIのFR（フレームワーク）領域を持ったVH領域〔SG I：英國MRC Collaborative Center のDr. Bendigより分与されたもの〕へ移植し（図8、図10）、 $\mu$ 39.1及び $\mu$ 5.5のVL領域のCDR領域はヒトκ鎖のFR領域を持ったVL領域〔REI：W. Palm and N. Hilsmann Z. Physiol. Chem., 356, 167 (1975)〕に移植した（図9、図11）。具体的には、改変抗体はアマシャムのキット(Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system version 2 code RPN. 1523)とPCR[Saiki, R. G. et al., Science, 239, 487 (1988)]を組み合わせたアマシャム-PCR法により行なった。 $\mu$ 39.1あるいは $\mu$ 5.5のVH、VL領域の移植部位をコードする長鎖又クレオチドを、SG IあるいはRE IのV領域遺伝子を組み込んだM13DNAにアニーリングさせた後にdCTP $\alpha$ Sを含む溶液中でDNAの伸長・結合を行い、NciIで鋳型M13DNAを切断、Exonuclease IIIによる鋳型DNAの消化を行なって突然変異したM13DNAのみのストランドを得た（ここまでアマシャムのキットのプロトコールにしたがって行なった）。さらに、Exonuclease III消化産物を鋳型にユニバーサルプライマー（UP:M13mp18の5'側に相補的な配列を持つ）とリバースプライマー（RSP:M13mp18の3'側と同じ配列を持つ）を用いてPCRを行なった。これらのプライマーはともに20 pmol使い、PCRの試薬はCETUS社のものを使用した。PCRの条件は、94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分で25サイクル行なった。PCR終了後、産物をBamHI/HindIIIで消化しpUC18のBamHI-HindIIIサイトに組み込み、DH5 $\alpha$  (BRL社)に形質転換し、1次スクリーニングとして、突然変異に使用したCDRプライマーを用いてアマシャムキットのプロトコールにしたがってコロニーハイブリダイゼーションを行ない、CDRの突然変異に成功しているクロー＊

#### 配列

CAG ATC CAG ATG GTG CAG TCT GGA CCT GAG TTG AAG AAG CCT GGA GAG	48
Gln Ile Gln Met Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA AAA TAT	96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr	
20 25 30	
GGA ATG AAC TGG GTG AAA CAG ACT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	
GGC TGG AAA AAC ACC AAT ACT GGA GAG GCA ACA CAT GTT GAA GAG TTC	192

\*ンを選んだ。さらに、2次スクリーニングとして、1次スクリーニングで得られたクローンよりプラスミドを調製しシーカナーゼキット（東洋紡）を用いてシーケンスを行ない、正確にCDR移植が出来ていることを確認した。このようにして改変された $\mu$ 39.1、 $\mu$ 5.5のV領域（それぞれRH $\mu$ 39.1、RL $\mu$ 39.1、RH $\mu$ 5.5、RL $\mu$ 5.5：図8～図11参照）を得た。これらの改変V領域断片を(4)のキメラ抗体の作製と同様にしてHindIIIとBamHI制限酵素で消化し、VH、VL断片をそれぞれHCMV- $\gamma$ 1、HCMV- $\kappa$ のHindIII-BamHIサイトに組み込んだ。このようにして $\mu$ 39.1改変抗体遺伝子発現ベクター（それぞれRH $\mu$ 39.1、RL $\mu$ 39.1）、及び $\mu$ 5.5改変抗体遺伝子発現ベクター（それぞれRH $\mu$ 5.5、RL $\mu$ 5.5）が調製された。

#### 【0030】(7) 抗HIV改変抗体の発現

この改変 $\mu$ 39.1、 $\mu$ 5.5抗体遺伝子によって得られる抗体活性を前述のCOS7細胞における一時的発現系で検討した。(5)の場合と同様にして遺伝子導入細胞の培養上清を回収、抗ヒトIgGあるいはSP-1ペプチドを用いたELIS A法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果図7に示すように、RH $\mu$ 39.1及びRL $\mu$ 39.1プラスミドDNAの混合物、あるいはRH $\mu$ 5.5及びRL $\mu$ 5.5プラスミドDNAの混合物の発現産物のいずれもがSP-1ペプチドに結合した。従って図9～図12で示された $\mu$ 39.1、 $\mu$ 5.5のアミノ酸配列の中で移植CDR領域は抗HIV活性を担う重要な領域であることが確認された。この結果から、これらの領域をコードする遺伝子は組換え抗HIV抗体を作製するにあたり、極めて有用な遺伝子であることが確認された。

#### 【0031】配列番号：1

配列の長さ：357

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

15

16

Gly Trp Lys Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ser Thr His Val Glu Glu Phe			
50	55	60	
AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGT ACT GCC TAT			240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT			288
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
85	90	95	
GCA AGA GAA TAT GAT TAC GAC GGG GGC TTT TCT TAC TGG GGC CAA GGG			336
Ala Arg Glu Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA			357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			

【2022】期別受付：2

【0032】配列番

配列の長さ：3,3,1

### 配列の型：核酸

### 鎖の数・一本鎖

トポロジー・直鎖状

\* 配列の種類: cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

### 生物名：マウス

\*

配列

GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
1 5 10 15	
GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GGT GCT GAT	96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Asp	
20 25 30	
GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA CAA CTG ATT	144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Gln Leu Ile	
35 40 45	
TCC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC	192
Ser Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
50 55 60	
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT ACC AAT GTG CAG TCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser	
65 70 75 80	
GAA GAC TTG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TTT CCT CTC	288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu	
85 90 95	
ACG TTC GGT ACT GGG ACC AAG TTG GAG CTG AGA	321
Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg	
100 105	

【0033】配列番号：3

配列の長さ：3 5 4

### 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類: cDNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

1

配列

GAG GTC CAG CTG CAA CAG TCT GGG CCT GAC CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 500 15

17

18

TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG ACT TCT GGA TAC ACA TTC ACT GAA TAC 96  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30  
 ACC ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AGG AGC CTT GAG TGG ATT 144  
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 GGA GGT ATT AAT CCT AAC AAT GGT GAT ACT AGC TAC ACC CAG AAG TTC 192  
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 AAG GCC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTC TAT TAC TGT 288  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 GCA ACA CCC TAC TAT GCC TAT GCT ATT GAC TCC TGG GGT CAA GGA ACC 336  
 Ala Thr Pro Tyr Tyr Ala Tyr Ala Ile Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 TCA GTC ACC GTC TCC TCA 354  
 Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

【0034】配列番号：4

配列の長さ：333

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：c DNA to genomic RNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

\*

配列

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG 48  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT 96  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30  
 GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC 144  
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGG ATC CCA GCC 192  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60  
 AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT 240  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 CCT GTG GAG GAG GAT GGT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT 288  
 Pro Val Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95  
 GAG GAT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 333  
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

【0035】配列番号：5

配列の長さ：357

※配列の型：核酸

※50 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 起源

配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

生物名：マウスおよびヒト

配列の特徴

\*

## 配列

CAG	GTG	CAA	CTA	GTG	CAG	TCC	GCC	GCC	GAA	GTG	AAG	AAA	CCC	GGT	GCT	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1					5				10				15			
TCC	GTG	AAG	GTG	AGC	TGT	AAA	GCT	AGC	GGT	TAT	ACC	TTC	ACA	AAA	TAT	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	
					20				25			30				
GGA	ATG	AAC	TGG	GTT	AGA	CAG	GCC	CCA	GGG	CTC	AAG	TGG	ATG		144	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	
					35				40			45				
GGC	TGG	AAA	AAC	ACC	AAT	ACT	GGA	GAG	TCA	ACA	CAT	GTT	GAG	GAG	TTT	192
Gly	Trp	Lys	Asn	Thr	Asn	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	His	Val	Glu	Glu	Phe	
					50				55			60				
AAG	GGC	AGG	GTT	ACC	ATG	TCC	TTG	GAC	ACC	TCT	ACA	AAC	ACC	GCC	TAC	240
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	
					65				70			75			80	
ATG	GAA	CTG	TCC	AGC	CTG	CGC	TCC	GAG	GAC	ACT	GCA	GTT	TAC	TAC	TGC	288
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85				90			95				
GCC	AGA	GAA	TAT	GAT	TAC	GAC	GGG	GGC	TTC	TCC	TAT	TGG	GGA	CAG	GGT	336
Ala	Arg	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
					100				105			110				
ACC	CTT	GTC	ACC	GTC	AGT	TCA									357	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
					115											

【0036】配列番号：6

※配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の長さ：321

30 配列の特徴

配列の型：核酸

起源

鎖の数：二本鎖

生物名：マウスおよびヒト

トポロジー：直鎖状

※

## 配列

GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	AGC	CCA	AGC	AGC	CTG	AGC	GCC	AGC	GTG	GGT	48
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
1			5				10			15						
GAC	AGA	GTG	ACC	ATC	ACC	TGT	AAA	GCC	AGC	CAG	GAT	GTG	GGT	GCT	GAT	96
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Ala	Asp	
					20				25			30				
GTA	GCT	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGT	AAG	GCT	CCA	AAG	CTG	CTG	ATC	144
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
					35				40			45				
TCC	TGG	GCA	TCC	ACC	CGG	CAC	ACT	GGT	GTG	CCA	AGC	AGA	TTC	AGC	GGT	192
Ser	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
					50				55			60				
AGC	GGT	AGC	GGT	ACC	GAC	TTC	ACC	TTC	ATC	AGC	AGC	CTC	CAG	CCA	240	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
					65				70			75			80	
GAG	GAC	ATC	GCC	ACA	TAC	TAC	TGC	CAA	5CAA	TAT	AGC	AGC	TTT	CCA	CTC	288

21

22

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA 321  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

【0037】配列番号：7

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の特徴

起源

生物名：マウスおよびヒト

\* 10

配列

CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 TCC GTG AAG GTG AGC TGT AAA GCT AGC GGT TAT ACC TTC ACT GAA TAC 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30  
 ACC ATG CAT TGG GTT AGA CAG GCC CCA GGC CAA GGG CTC GAG TGG ATT 144  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 GGC GGT ATT AAC CCT AAC AAT GGC GAT ACA AGC TAT ACC CAG AAG TTT 192  
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 AAG GGC AAG GCT ACC ATG ACC GTA GAC ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC 240  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTT TAC TAC TGC 288  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 GCC ACA CCC TAC TAC GCC TAC GCT ATT GAC TCC TGG GGA CAG GGT ACC 336  
 Ala Thr Pro Tyr Tyr Ala Tyr Ala Ile Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 CTT GTC ACC GTC AGT TCA 354  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

【0038】配列番号：8

配列の長さ：333

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：その他の核酸（合成核酸）

配列の特徴

起源

生物名：マウスおよびヒト

※ 40

配列

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30  
 GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA 144  
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 50 45

AAG CTG CTG ATC TAC GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT GGT GTG CCA AGC	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser	
50 55 60	
AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser	
65 70 75 80	
AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAA AGT AAT	288
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn	
85 90 95	
GAG GAC CCA TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA	333
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105 110	

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 $\mu$ 39.1のH鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図2】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 $\mu$ 39.1のL鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図3】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 $\mu$ 5.5のH鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図4】 実施例(3)で示した抗HIV中和抗体 $\mu$ 5.5のL鎖可変領域をコードする本発明のDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図5】 実施例(4)で構築した抗HIVキメラ抗体H鎖発現プラスミドCH $\mu$ 39.1およびCH $\mu$ 5.5の構造を示す。

【図6】 実施例(4)で構築した抗HIVキメラ抗体L鎖発現プラスミドCL $\mu$ 39.1およびCL $\mu$ 5.5の構造を示す。

【図7】 実施例(5)で測定した抗HIVキメラ抗体 $\mu$ 39.1および実施例(7)で測定した抗HIV改変抗体 $\mu$ 39.1 \*

\* の抗HIV活性を示す。

【図8】 実施例(5)で測定した抗HIVキメラ抗体 $\mu$ 5.5および実施例(7)で測定した抗HIV改変抗体 $\mu$ 5.5の抗HIV活性を示す。

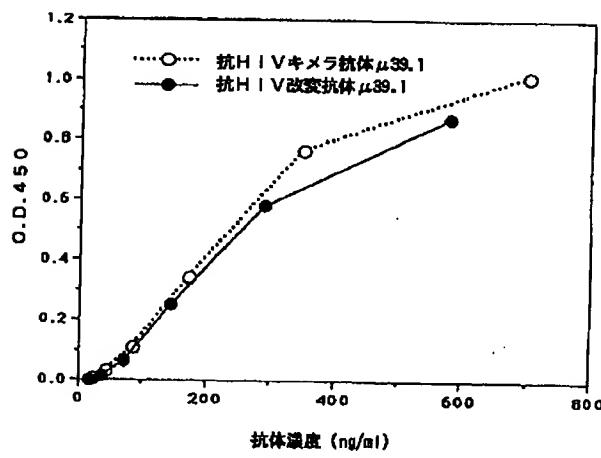
【図9】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 $\mu$ 39.1H鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図10】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 $\mu$ 39.1L鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

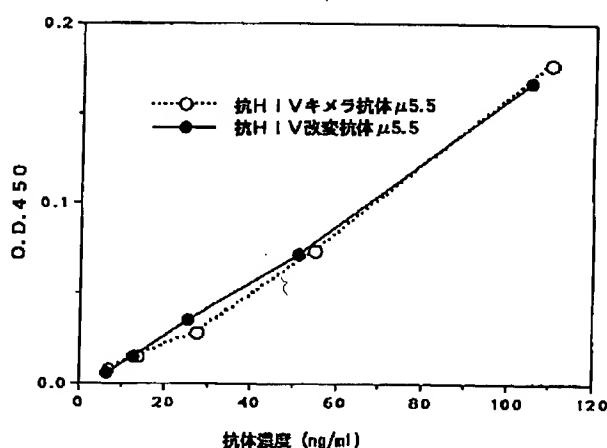
【図11】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 $\mu$ 5.5H鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図12】 実施例(6)で調製した抗HIV改変抗体 $\mu$ 5.5L鎖の可変領域をコードするDNA断片の核酸配列およびアミノ酸配列を示す（下線部分の配列がマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す）。

【図7】



【図8】



## 【図1】

| FR1

1 CAGATCCAGATGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGATC  
GlnIleGlnMetValGlnSerGlyProGluLeuLysLysProGlyGluThrValLysIle

| CDR1 | FR2

61 TCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAAAATATGGAATGAACCTGGGTGAAACAGACT  
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrLysTyrGlyMetAsnTrpValLysGlnThr

| CDR2

121 CCAGGAAAGGGTTAAAGTGGATGGCTGGAAAAACCCAATACTGGAGAGTCACACAT  
ProGlyLysGlyLeuLysTrpMetGlyTrpLysAsnThrAsnThrGlyGluSerThrHis

| FR3

181 GTTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTGCCTCTTGGAAACCTCTGCCAGTACTGCCTAT  
ValGluGluPheLysGlyArgPheSerLeuGluThrSerAlaSerThrAlaTyr

|

241 TTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTCTGTGCAAGAGAAATAT  
LeuGlnIleAsnAsnLeuLysAsnGluAspThrAlaThrTyrPheCysAlaArgGluTyr

CDR3 | FR4

301 GATTACGACGGGGCTTTCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA  
AspTyrAspGlyGlyPheSerTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerAla

## 【図2】

| FR1

1 GACATITGTGATGACCCAGTCTCACAAATTATGTCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC  
AspIleValMetThrGlnSerHisLysPheMetSerThrSerValGlyAspArgValSer

| CDR1 | FR2

61 ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTGCTGATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA  
IleThrCysLysAlaSerGlnAspValGlyAlaAspValAlaTrpTyrGlnGlnLysPro

| CDR2 | FR3

121 GGACAATCTCCTAACAACTGATTCCTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT  
GlyGlnSerProLysGlnLeuIleSerTrpAlaSerThrArgHisThrGlyValProAsp

| CDR3 | FR4

181 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATACCAATGTGCAGTCT  
ArgPheThrGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleThrAsnValGlnSer

| CDR3 | FR4

241 GAAGACTTGGCAGATTATTCCTGTCAGCAATATAGCAGCTTCCTCTCACGTTGGTACT  
GluAspLeuAlaAspTyrPheCysGlnGlnTyrSerSerPheProLeuThrPheGlyThr

301 GGGACCAAGTTGGAGCTGAGA  
GlyThrLysLeuGluLeuArg

## 【図3】

| FR1

1 GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGCCTGACCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATA  
GluValGlnLeuGlnGlnSerGlyProAspLeuValLysProGlyAlaSerValLysIle

| CDR1 | FR2

61 TCCTGCAAGACTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATGCAGTGGTGAAGCAGAGC  
SerCysLysThrSerGlyTyrThrPheThrGluTyrThrMetHisTrpValLysGlnSer

| CDR2

121 CATGGAAGGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAAATGGTATACTAGCTAC  
HisGlyArgSerLeuGluTrpIleGlyGlyIleAsnProAsnAsnGlyAspThrSerTyr

| FR3

161 ACCCAGAAGTTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTAC  
ThrGlnLysPheLysGlyLysAlaThrLeuThrValAspSerSerSerThrAlaTyr

|

241 ATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACACCCCTAC  
MetGluLeuArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaThrProTyr

CDR3 | FR4

301 TATGCCTATGCTATTGACTCCTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA  
TyrAlaTyrAlaIleAspSerTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer

## 【図4】

| FR1

1 GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGCCACC  
AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGlnArgAlaThr

| CDR1 | FR2

61 ATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGGTATTATGATGGTATACTATGAACGGTAC  
IleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsnTrpTyr

| CDR2

121 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCT  
GlnGlnLysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAlaAlaSerAsnLeuGluSer

| FR3

181 GGGATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTAACATCCAT  
GlyIleProAlaArgPheSerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHis

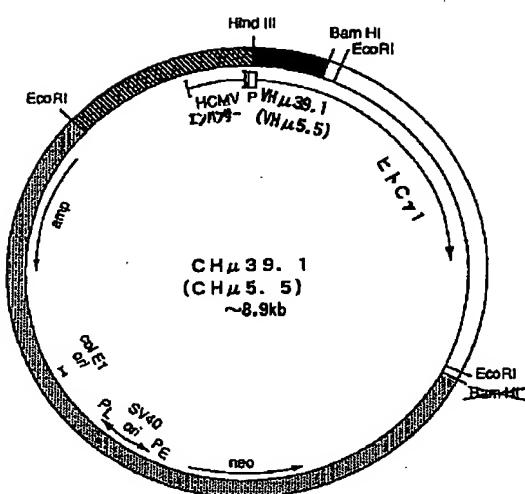
| CDR3

241 CCTGTGGAGGAGGAGGATGGTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGG  
ProValGluGluGluAspGlyAlaThrTyrTyrCysGlnGlnSerAsnGluAspProTrp

| FR4

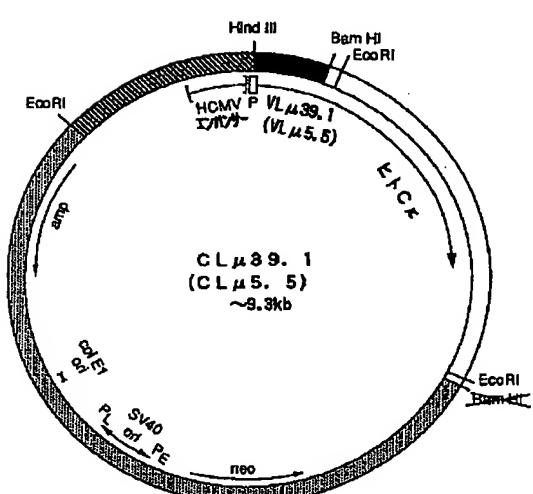
301 ACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA  
ThrPheGlyGlyThrLysLeuGluIleLys

【図5】



- マウスVH遺伝子断片
- ヒトC $\gamma$ 1遺伝子断片
- ▨ HCMV
- ▨ pSV2neo

【図6】



- マウスVL遺伝子断片
- ヒトC $\alpha$ 遺伝子断片
- ▨ HCMV
- ▨ pSV2neo

## 【図9】

| FR1

1 CAGGTGCAACTAGTGCAGTCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTCTTCCGTGAAGGTG  
GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysVal

| CDR1 | FR2

61 AGCTGTAAAGCTAGCGTTATACCTTCACAAAATATGGAATGAACGTGGTTAGACAGGCC  
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrLysTyrGlyMetAsnTrpValArgGlnAla

| CDR2

121 CCAGGCCAAGGGCTCAAGTGGATGGCTGGAAAAACCCAATACTGGAGAGTCAACACAT  
ProGlyGlnGlyLeuLysTrpMetGlyTrpLysAsnThrAsnThrGlyGluSerThrHis

| FR3

181 GTTGAGGAGTTAACGGCAGGGTTACCATGTCCTGGACACCTCTACAAACACCGCCTAC  
ValGluGluPheLysGlyArgValThrMetSerLeuAspThrSerThrAsnThrAlaTyr

|

241 ATGGAACGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTTACTACTGCGCCAGAGAATAT  
MetGluLeuSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluTyr

CDR3 | FR4

301 GATTACGACGGGGCTTCTCCTATTGGGGACAGGGTACCCCTGTACCGTCAGTTCA  
AspTyrAspGlyGlyPheSerTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSer

## 【図10】

| FR1

1 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGTGACAGAGTGACC  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

| CDR1 | FR2

61 ATCACCTGTAAAGCCAGCCAGGATGTGGTGCTGATGTAGCTGGTACCAAGCAGAAGCCA  
Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

| CDR2 | FR3

121 GTAAAGGCTCAAAGCTGCTGATCTCCTGGGCATCCACCCGGCACACTGGTGCCAAAGC  
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser

| CDR3 | FR4

181 AGATTCAAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCA  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

| CDR3 | FR4

241 GAGGACATGCCACATACTACTGCCAACAAATATAGCAGCTTCCACTCACGTTGGCCAA  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln

301 GGGACCAAGGTGGAAATCAA  
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

## 【図11】

| FR1

1 CAGGTGCAACTAGTCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTTCGTGAAGGTG  
GlnValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysVal

| CDR1 | FR2

61 AGCTGTAAAGCTAGCGTTATACCTTCAGTGAATAACACCATGCATTGGGTTAGACAGGCC  
SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrGluTyrThrMetHisTrpValArgGlnAla

| CDR2

121 CCAGGCCAAGGGCTCGAGTGGATTGGCGGTATTAACCTAACAAATGGCGATAACAAGCTAT  
ProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGlyGlyIleAsnProAsnAsnGlyAspThrSerTyr

| FR3

181 ACCCAGAAGTTAACGGCAAGGCTACCATGACCGTAGACACCTCTACAAACACCGCCTAC  
ThrGlnLysPheLysGlyLysAlaThrMetThrValAspThrSerThrAsnThrAlaTyr

|

241 ATGGAACGTGTCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTTACTACTGCCACACCCCTAC  
MetGluLeuSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaThrProTyr

CDR3

| FR4

301 TACGCCCTACGCTATTGACTCCTGGGGACAGGGTACCCCTGTCACCGTCAGTICA  
TyrAlaTyrAlaIleAspSerTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSer

## 【図12】

| FR1

1 GACATCCAGATGACCCAGAGCCAAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACC  
AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThr

| CDR1 | FR2

61 ATCACCTGTAAGGCCAGCAAAGTGGTATTATGATGGTATAGTTATGAACTGGTAC  
IleThrCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrMetAsnTrpTyr

| CDR2

121 CAGCAGAAGCCAGGTAAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACGCTGCATCCAATCTAGAACATCT  
GlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrAlaAlaSerAsnLeuGluSer

| FR3

181 GGTGTGCCAAGCAGATTCAAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTTCACCATCAGC  
GlyValProSerArgPheSerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSer

| CDR3

241 AGCCTCCAGCCAGAGGACATGCCACCTACTACTGCCAGCAAAGTAATGAGGACCCATGG  
SerLeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrTyrCysGlnGlnSerAsnGluAspProTrp

| FR4

301 ACGTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA  
ThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIleLys

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup> // (C 1 2 P 21/08 C 1 2 R 1:91)	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
--	------	--------	-----	--------

(72)発明者 長富 潔  
熊本県熊本市竜田町上立田1687-5 パナハ  
イツ102号

(72)発明者 時吉 幸男  
熊本県熊本市若葉3丁目14-19